

University of Groningen

## Oxygenated machine perfusion of donor livers and limbs

Burlage, Laura

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Burlage, L. (2019). *Oxygenated machine perfusion of donor livers and limbs: Studies on endothelial activation and function*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen].

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# CHAPTER 12

Nederlandse samenvatting





## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Het succes van orgaan transplantatie hangt nauw samen met kwaliteit van het te transplanteren donororgaan. Geoxygeneerde machine perfusie krijgt steeds meer aandacht als alternatieve methode voor orgaanpreservatie, omdat het gebruikt kan worden om de kwaliteit van zo genoemde ‘extended criteria donor’ (ECD) organen te verbeteren en te beoordelen voorafgaand aan transplantatie. Dit kan uiteindelijk leiden tot transplantatie van meer en betere kwaliteit organen. In dit proefschrift wilde ik de effecten van geoxygeneerde machine perfusie op zowel donorlevers als ledematen in meer detail bestuderen. Wij hebben de effecten van machine perfusie op endotheel activatie en functie onderzocht en de effecten van nieuwe perfusieoplossingen op transplantaatfunctie uitgezocht, zowel *ex situ* als *in vivo*. In dit hoofdstuk worden de belangrijkste bevindingen van de studies die beschreven staan in dit proefschrift samengevat. Tot slot wordt dit hoofdstuk afgesloten met een sectie waarbij de toekomstperspectieven worden besproken. Een algemene inleiding van dit proefschrift staat beschreven in **hoofdstuk 1**.

### DEEL A: Geoxygeneerde machine perfusie en transplantatie van humane levers

In **hoofdstuk 2** wordt de mogelijke impact van machine perfusie als alternatieve methode voor orgaanpreservatie besproken, met name voor donor levers na ‘donatie na circulatoire dood’ (DCD). In een poging om het dringende tekort aan organen te overwinnen, worden DCD donoren steeds meer gebruikt als een nieuwe bron van donororganen. Het succes van DCD levertransplantatie hangt echter sterk af van de methode om de vitaliteit van het orgaan voorafgaand aan transplantatie te conserveren. In dit hoofdstuk wordt kort ingegaan op de verschillende definities die bij DCD donaties worden gebruikt. Wij bespraken de basisprincipes van orgaanpreservatie en schetsten de chronologische ontwikkeling in de hernieuwde belangstelling voor machine perfusie. Wij trachten een uitgebreid overzicht geven van de verschillende machine perfusiemodaliteiten, inclusief verschillen in timing, temperatuur, vasculaire route van perfusie (enkel of dubbel), en stromingseigenschappen (pulserend of niet-pulserend). Wij concludeerden dat machinale perfusie veel voordelen biedt ten opzichte van statisch koude preservatie – de huidige gouden standaard. Alle vormen van machinale perfusie dienen echter hun eigen doel en hebben allemaal hun voor- en nadelen. Daarom is er niet één ‘ultiem’ type machine perfusie. Wij concludeerden dat uiteindelijk een combinatie van verschillende methoden van machine perfusie kan worden gebruikt, gespecialiseerd voor de behoeften per orgaan. Interessant is dat recente onderzoeken ook het gebruik van machine perfusie onderzoeken om

ischemievrije orgaantransplantatie (IFOT) beschrijven (1, 2). In de komende decennia zou deze interessante techniek van IFOT de voorkeursmethode kunnen worden voor preservatie van ECD organen.

**In hoofdstuk 3** hebben wij het effect van eind-ischemische, geoxygeneerde hypotherme machine perfusie (HMP) op de endotheelcelfunctie van ECD levers onderzocht. In deze studie werden donor levers geïncubeerd die waren afgekeurd voor transplantatie. Na een periode van statische koude preservatie (SCS) tijdens transport naar ons centrum, werd de vitaliteit van alle levers getest middels normotherme machine perfusie (NMP); ofwel direct bij aankomst (controle group) ofwel voorafgegaan door 2 uur HMP. In beide groepen werden bipten genomen van de lever bij aankomst en na NMP. Tevens werden er tijdens NMP samples genomen van het perfusaat. Aan het einde van NMP was de relatieve mRNA-expressie van de flow-induceerbare transcriptiefactor Krüppel-achtige factor 2 (KLF2) en de 'downstream' genen endotheel stikstofoxidesynthase (eNOS) en trombomoduline (TM) significant hoger in HMP-bewaarde levers vergeleken met controles. De verhoogde fosforylatie van eNOS via KLF2 zou, op zijn minst gedeeltelijk, de verhoogde NO-productie en verhoogde vasculaire flow in HMP levers tijdens NMP kunnen verklaren. Als markers voor schade aan het endotheel werd trombomoduline in het perfusaat gemeten. Aan het einde van NMP was de concentratie TM significant hoger in controle levers in vergelijking met HMP-levers. Tevens hebben wij een histologische schade score ontwikkeld om microvasculaire schade van endotheelcellen te beoordelen. Na zes uur NMP was de (histologische te beoordelen) schade aan de arteriële bloedvaten significant minder in HMP-bewaarde levers vergeleken met controle levers. Dit hoofdstuk geeft daarom aan dat een korte periode van geoxygeneerde HMP, na een periode van SCS en voorafgaand aan NMP, van ECD-levers de kwaliteit van de endotheelcellen bevordert.

**In hoofdstuk 4** hebben wij cellulaire shifts van natrium en kalium bestudeerd tijdens eind-ischemische geoxygeneerde machine perfusie en daaropvolgende reperfusie *ex situ* of *in vivo*. De reden om deze shifts in detail te bestuderen was de onverwachte observatie tijdens onze eerste klinische pilot studie van end-ischemische, geoxygeneerde HMP levertransplantaties, dat reperfusie van HMP-gepreserveerde levers leidde tot ernstige hypokaliëmie tijdens transplantatie bij drie van de tien patiënten. Wij ontdekten dat levers tijdens HMP kalium uitstoten en natrium opnemen. De mate van kalium- en natriumveranderingen tijdens HMP kwam overeen met de klinische observatie dat de kalium levels van de ontvanger afnamen na reperfusie van een HMP-bewaarde lever, terwijl de levels toenamen na reperfusie van een SCS-geconserveerde lever. Bovendien werden vergelijkbare verschuivingen in kalium en natrium levels waargenomen tijdens *ex situ* reperfusie van HMP-gepreserveerde levers. Deze studie toonde aan dat reperfusie

van HMP-gepreserveerde levers kan leiden tot verlaagd kalium concentratie in het bloed (of zelfs hypokaliëmie) van de ontvanger. Bij toenemend klinisch gebruik van HMP als een alternatieve methode voor orgaanpreservatie, moeten anesthesiologen en chirurgische teams er op voorbereid zijn op kalium shifts tijdens transplantatie van een HMP-gepreserveerde levers tegengesteld zijn aan de (verwachte) kalium shifts van de transplantatie van SCS-gepreserveerde levers.

In **hoofdstuk 5** hebben wij geprobeerd een nieuwe NMP preservatievloeistof te ontwikkelen, die het gebruik van humane bloedproducten overbodig zou maken. Wij hebben achtereenvolgens de rode bloedcellen (RBC's) vervangen door HBOC-201, een acellulaire op hemoglobine gebaseerde zuurstofdrager, en bevroren plasma (FFP) is vervangen door de colloïde oplossing gelofusine. Levers die geperfundeerd werden met RBCs en FFP werden als controles gebruikt. Wij concludeerden dat levers die met HBOC-201 geperfundeerd waren, een significant hoger ATP-gehalte hadden vergeleken met controle levers. Tevens was de cumulatieve galproductie en bloed doorstroming (zowel portaal als arterieel) significant hoger in HBOC-201 levers vergeleken met controles. Ook was de concentratie van schademarkers ALAT lager in HBOC-201 geperfundeerde levers vergeleken met controles. Levers die tijdens NMP geperfundeerd werden met HBOC-201 waren qua functie gelijk (en op sommige punten zelfs beter) dan levers die geperfundeerd werden met RBCs. NMP van menselijke levers kan dus effectief worden uitgevoerd met een perfusie vloeistof gebaseerd op HBOC-201 en gelofusine. Momenteel wordt in de eerste klinische studie uitgevoerd waarin een op HBOC-201-gebaseerde perfusievloeistof wordt gebruikt voor de perfusie van ECD levers voorafgaand aan transplantatie (3).

**Hoofdstuk 6** beschrijft een deelstudie van het vorige hoofdstuk. In hoofdstuk 6 hebben we het effect van HBOC-201 bestudeerd op de functie van endotheel cellen van donorlevers tijdens *ex situ* NMP. De reden om het effect van HBOC-201 op de functie van endotheel cellen te onderzoeken waren de ernstige hemodynamische complicaties die zijn gemeld bij patiënten die HBOCs kregen om hemorragische shock te behandelen in de setting van een klinische studie. Er werd gedacht dat de acellulaire Hb-moleculen vasoconstrictie veroorzaakten vanwege '*nitric oxide (NO) scavenging*'. De belangrijkste bevinding van deze studie was dat de cumulatieve NO-productie niet daalde tijdens *ex situ* NMP van een op HBOC-201 gebaseerde perfusieoplossing. Na 6 uur NMP waren de cumulatieve NO-waarden van HBOC-201-geperfundeerde levers vergelijkbaar met de waarden van RBC-geperfundeerde levers. Het feit dat in deze studie slechts beperkte mate van '*NO scavenging*' werd geobserveerd kan te wijten zijn aan de polymerisatie van HBOC-201. HBOC-201-polymerisatie is een strategie om extravasatie van HBOCs-moleculen te voorkomen, wat '*NO scavenging*' beperkt. Verder vonden we dat de

relatieve expressie van hypoxie-induceerbare factor HIF-2a significant hoger was in HBOC-201 levers, vergeleken met RBC-geperfundeerde levers. Dit zou erop kunnen wijzen dat HBOC-201 geperfundeerde levers meer resistent zijn tegen oxidatieve schade in vergelijking met RBC-geperfundeerde levers.

In **hoofdstuk 7** onderzochten wij de *in vitro* effecten van recombinant oplosbaar humaan trombomoduline (ART-123) op de coagulatie en fibrinolyse van patiënten met eindstadium leverfalen die een levertransplantatie ondergingen. ART-123 wordt klinisch gebruikt als een antistollingsmiddel en ontstekingsremmend middel in de behandeling van gedissemineerde intravasculaire stolling. Wij waren echter geïnteresseerd in ART-123 voor een andere reden. In preklinische studies werden veel belovende resultaten gemeld dat ART-123 de I/R-schade van donorlevers efficiënt kan verminderen. Voor deze studie werden plasma verzameld van 10 patiënten die een levertransplantatie ondergingen, tijdens transplantatie en in de dagen daarna. Om referentiewaarden in te stellen, zijn ook monsters van 10 gezonde controles gebruikt in deze studie. Verschillende plasmaconcentraties van ART-123 werden toegevoegd en zowel de piek trombinegeneratie als de fibrinolyse-tijden van het stolsel werden bepaald. Vergeleken met controles, vonden we dat het plasma van patiënten resistent was tegen de antistollende werking van ART-123. Dit kan worden verklaard door lage levels van proteïne C, proteïne S en verhoogde levels van factor VIII bij patiënten die een levertransplantatie ondergaan. Verder verschilde ART-123-afhankelijke verlenging van stolsel-lysisstijden niet van gezonde controles. Deze studie suggereerde dat het onwaarschijnlijk is dat ART-123 bloedingen zal veroorzaken bij patiënten die een levertransplantatie ondergaan. Echter, er zijn meer klinische studies nodig om het veilige gebruik van ART-123 tijdens levertransplantatie te bevestigen.

## **DEEL B: Geoxygeneerde machine-perfusie en transplantatie van ledematen**

In **hoofdstuk 8** werd een overzicht gegeven van nieuwe strategieën die de langdurige preservatie 'vascularized composite allotransplantatie' (VCA) grafts mogelijk maken. Samengevat is de huidige methode van statische koude preservatie ontoereikend voor de langdurige preservatie van VCA grafts. Nieuwe ontwikkeling op het gebied van VCA, onder andere met betrekking tot matching, desensibilisatie en potentiële tolerantie-inductie vereisen echter allemaal dat VCA grafts uren tot dagen vitaal blijven. De potentie van machine perfusie als nieuwe preservatiemethode wordt in dit hoofdstuk besproken. Ook worden voor- en nadelen van meer extreme preservatie methoden, zoals cryopreservatie, besproken.

Een complicerende factor in de zoektocht naar de optimale VCA graft preservatie methode, is de heterogene aard van VCA-transplantaten, omdat alle weefseltypes hun eigen gevoeligheid voor (koude) ischemie en cryoprotectieve middelen hebben. Wij zijn van mening dat in de huidige reikwijdte van protocollen voor langdurige bewaring, 'high subzero' preservatie protocollen veelbelovend lijken voor de preservatie van VCA grafts. Langdurige preservatie middels deze nieuwe techniek kan de klinische toepassing van VCA als een reconstructieve optie voor patiënten over de hele wereld vergroten.

In **hoofdstuk 9** hebben we een protocol ontwikkeld voor 6 uur subnormotherme machine perfusie (SNMP). Als model voor een gevasculariseerd samengesteld allotransplantaat gebruikten wij de achterpoot van een rat. Wij vergeleken drie verschillende perfusieoplossingen; allemaal op basis van kweekmedium voor spiercellen, met de toevoeging van polyethyleenglycol en de acellulaire zuurstofdrager HBOC-201. Van alle groepen, was de piek zuurstofextractie was beter in HBOC-201 geperfundeerde ledematen. Bovendien was de cellulaire energielading vergeleken met conservatief gepreserveerde ledematen significant hoger in ledematen die gepreserveerd werden met HBOC-201. De levensvatbaarheid van de HBOC-201-geperfundeerde ledematen werd bevestigd met een heterotopie transplantatie en een succesvolle follow-up van een week. Samenvattend demonstreerde dit hoofdstuk dat 6 uur *ex situ* SNMP van achterpoten van de rat haalbaar is, en dat dit resulteert in superieure weefsel preservatie in vergelijking met conventionele koude preservatiemethoden. Huidige studies onderzoeken de verlenging van de preservatie tijd van VCA-transplantaten, door ons SNMP-protocol te implementeren in een preservatie protocol dat 24 uur per dag duurt.

In het addendum **hoofdstuk 10** geven wij een gedetailleerde samenvatting van ons recent ontwikkelde 24-uurs 'subzero non-freezing' protocol voor langdurige bewaring van ledematen.

De studies beschreven in dit proefschrift hebben geresulteerd in meer inzicht in het effect van geoxygeneerde machine perfusie, met nieuwe perfusie oplossingen, op endotheelcelfunctie van zowel levers als ledematen.

### **Concluderend, zijn de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift:**

1. Eind-ischemische geoxygeneerde hypotherme machine perfusie verbetert de endotheelcelfunctie van ECD donorlevers



2. Eind-ischemische geoxygeneerde hypotherme machine perfusie van donorlevers resulteert in kalium en natrium verschuivingen die tegengesteld zijn aan de verschuivingen die worden waargenomen tijdens transplantatie van SCS-geconserveerde levers
3. Tijdens normotherme machine perfusie van ECD levers is de acellulaire zuurstofdrager HBOC-201 is een goed alternatief voor rode bloedcellen
4. Normotherme machine perfusie van ECD levers met een op HBOC-201 gebaseerde perfusie vloeistof resulteert in een hoger ATP-gehalte, betere bloed doorstroming en geconserveerde endotheelcel functie, in vergelijking met controles
5. Het is onwaarschijnlijk dat het gebruik van recombinant humaan oplosbaar trombomoduline (ART-123) bloedingen veroorzaakt bij patiënten die een levertransplantatie ondergaan, en ART-123 zou een interessante toevoeging zijn aan aan de perfusievloeistof tijdens *ex situ* perfusie van donorlevers
6. Subnormotherme machine perfusie met een op HBOC-201 gebaseerde perfusievloeistof resulteert in een betere preservatie van gevasculariseerde allografts in vergelijking statische koude preservatie

## REFERENCES

1. He X, Guo Z, Zhao Q, *et al.* The first case of ischemia-free organ transplantation in humans: A proof of concept. *Am J Transplant* 2018;18:737–744.
2. van Leeuwen OB, Ubbink R, de Meijer VE, Porte RJ. The first case of ischemia-free organ transplantation in humans: A proof of concept. *Am J Transplant* 2018;18:2091.
3. de Vries Y, van Leeuwen OB, Matton APM, Fujiyoshi M, de Meijer VE, Porte RJ. Ex situ normothermic machine perfusion of donor livers using a haemoglobin-based oxygen carrier: a viable alternative to red blood cells. *Transplant International* 2018;31:1283-1284.

